松褐天牛球孢白僵菌高毒力航天诱变菌株的筛选

王曦茁[1], 汪来发[1,*], 马建伟[1], 郭民伟[1], 刘洪剑[2], 董广平[2]

(1. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 国家林业局森林保护学重点实验室, 北京 100091;
2. 安徽省林业科学研究院, 合肥 230031)

摘要:【目的】松褐天牛 *Monochamus alternatus* 是我国松材线虫病 *Bursaphelenchus xylophilus* 的主要媒介昆虫。为了更好地开发利用松褐天牛病原微生物球孢白僵菌 *Beauveria bassiana*, 本研究通过航天搭载诱变及室内筛选, 获得球孢白僵菌高毒力诱变菌株。【方法】将经神舟八号飞船航天搭载诱变后的孢子稀释液涂布在 PDA 平板上培养, 获得单菌落菌株,进而筛选获得高毒力诱变菌株。观察所获 9 个航天诱变菌株的菌落形态、菌落生长速度、产孢量、孢子萌发率及抗高温胁迫能力等生物学特性, 在此基础上筛选出生物学性状优良的菌株 B159, B252 和 B305, 并进一步对松褐天牛 4 龄幼虫进行生物测定。再通过撒菌粉和注射菌液方法, 检验 B252 和 B305 对松木段内松褐天牛幼虫的杀虫效果。【结果】球孢白僵菌航天诱变菌株的生物学特性与野生型菌株 cfcc81357 存在分化。9 个航天诱变菌株的菌落形态发生了不同程度的改变,6 个菌落生长速率出现负向变异,仅诱变菌株 B159, B252 和 B305 能产生分生孢子。航天诱变菌株 B252 和 B305 在浓度为 1.0×10^7 cfu/mL 时对松褐天牛 4 龄幼虫的校正死亡率均为 100%, 半致死中时(LT_{50})分别为 8.08 和 8.56 d, 明显优于野生型菌株, 显示出对松褐天牛的极强毒力。使用撒菌粉和孢子液体注射方法, 诱变菌株 B252 和 B305 对松木段内松褐天牛幼虫死亡率比野生型菌株高。【结论】诱变菌株 B252 和 B305 可能是优良菌株, 对生物防治松褐天牛方面有潜在的实用价值。

关键词: 球孢白僵菌; 松褐天牛; 航天诱变; 微生物防治; 优良菌株; 致病力

中图分类号: Q965.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2014)11-1299-07

Screening of aerospace mutants of *Beauveria bassiana* with high virulence against *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae)

WANG Xi-Zhuo[1], WANG Lai-Fa[1,*], MA Jian-Wei[1], GUO Min-Wei[1], LIU Hong-Jian[2], DONG Guang-Ping[2] (1. Key Laboratory of Forest Protection, State Forestry Administration, Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. Anhui Academy of Forestry, Hefei 230031, China)

Abstract: 【Aim】 *Monochamus alternatus* is the major vector of pinewood nematode disease *Bursaphelenchus xylopilus* in China. We aimed to obtain high virulence mutants of *Beauveria bassiana* for biological control of *M. alternatus* through space mutation and laboratory selection. 【Methods】 A wild-type *B. bassiana* strain cfcc81357 isolated from *M. alternatus* had been carried into space for mutation induction by the Shenzhou 8 Spacecraft in 2011. Then, the obtained spore diluents were spread on PDA plate culture for single colony strains. Biological characteristics including the morphology, colony growing rate, spore production, conidia germination rate and conidial tolerance to thermal stress were compared between nine aerospace mutants and the original wild-type strain used as the control. Based on these results, three mutants (B159, B252 and B305) were adopted for further bioassay against the 4th instar larvae of *M. alternatus*. By sprinkling conidial powder on pine log surface and injecting conidia liquid into beetle-bored holes, the pathogenicity of the mutants B252 and B305 against *M. alternatus* larvae in pine logs was assessed. 【Results】 The results showed that these colony morphologies of nine aerospace mutants of *B. bassiana* changed at different degrees, of which six mutants had the colony growing rate obviously slowed down while only three mutants (B159, B252 and B305) produced conidial spores. Compared with the wild-type strain, mutant B252 and B305 had evidently higher virulence against *M. alternatus*, with a corrected mortality of 100% and the median lethal time (LT_{50}) of 8.08 and 8.56 d

---

基金项目: 国家高技术研究发展计划("863"计划)课题(2012AA101503); 国家微生物资源平台项目(NIMR2013-7)

作者简介: 王曦茁, 女, 1980 年生, 山东青岛人, 助理研究员, 研究方向为林木线虫病, E-mail: ladydal@sina.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: nema@caf.ac.cn; chenqx@xmu.edu.cn

收稿日期 Received: 2014-05-29; 接受日期 Accepted: 2014-10-17

when applied at the concentration of 1.0×10^7 spores/mL, respectively. 【Conclusion】 The results suggest that aerospace mutants B252 and B305 may be excellent strains with great application potential for biological control of *M. alternatus*.

Key words: *Beauveria bassiana*; *Monochamus alternatus*; aerospace mutagenesis; microbial control; superior strain; pathogenicity

由松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhrer) Nickle 引起的松材线虫病是我国重要的森林病害，严重威胁着我国的林业发展。在我国，松褐天牛 *Monochamus alternatus* Hope 是松材线虫病主要媒介昆虫，分布广泛，东至台湾、南至广东、西至西藏、西北至秦岭、北至河北、东北至辽宁均有分布(杨宝君等, 2003)。由于松褐天牛系蛀干害虫，羽化期长，对其防治十分困难。国内外在研究化学防治松褐天牛的同时,也开展了利用病原微生物防治松褐天牛的研究(Shimazu, 1994; 孙继美等, 1997; 徐福元等, 2000; 何学友等, 2005; 刘洪剑等, 2007)。

在所有的昆虫病原真菌中，球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. 在害虫防治应用方面最为广泛(蒲蛰龙和李增智, 1996)。在筛选松褐天牛球孢白僵菌菌株及防治方面已做了很多工作(张立钦等, 2000; 王四宝等, 2004; 韩兵等, 2007)。球孢白僵菌和其他昆虫病原真菌一样，作为生物农药，尽管具有化学农药不可比拟的诸多优点，但存在致死害虫的时间较长，且受环境影响较大、防治效果不稳定以及自身抗逆性较差等缺点。因此有必要对昆虫病原真菌进行遗传改良，才能更好地发挥防治效果。上世纪的菌株改良主要是通过原生质体融合等细胞工程手段，但所取进展极为有限(李增智等, 2011)。

利用球孢白僵菌防治松褐天牛，首先就要筛选出对松褐天牛具有高致病力的菌株。航天诱变为生物防治优良菌株遗传改良提供了新途径。有研究表明，一些微生物经过航天诱变，正向突变率和变异幅度大大高于常规诱变(张玲华和田兴山, 2004)。航天诱变育种技术作为一种有效的诱变育种新技术，已经在有效创造特异突变基因资源和培育作物新品种方面显示出重要的作用，成为空间科学研究的重要组成部分(刘录祥, 2003)。已有报道，我国第 18 颗返回式科学技术与实验卫星搭载昆虫病原真菌，虽成功地筛选到优良的金龟子绿僵菌航天诱变菌株，但同时搭载 3 个的球孢白僵菌菌株因死亡而无结果(农向群等, 2006)。本研究用松褐天牛幼虫上分离的球孢白僵菌进行搭载神舟八号飞船，比较球孢白僵菌诱变菌株生物学性状和毒力等指标，筛选出对松褐天牛具有强致病力的菌株，评价球孢白僵菌优良的航天诱变菌株防治松褐天牛的潜能，为以后的野外大规模防治奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试的球孢白僵菌菌株(菌株号 cfcc81357)系作者从江苏省溧水市马尾松树中感染白僵菌的松褐天牛幼虫分离纯化获得，经生物测定表明是具有生物防治应用潜力的菌株，现保存在中国林业微生物菌种保藏中心。

1.2 供试天牛

在安徽省安庆市大龙山林场采集松褐天牛幼虫，以越冬 4 龄幼虫为供试材料，室内饲养 2 d，剔除带机械损伤和行为不正常个体，选择健康、大小基本一致的幼虫用于生物测定试验。松褐天牛幼虫的人工饲养食料由中国林业研究院森林生态环境与保护研究所张永安研究员实验室提供。

1.3 航天搭载

将用 PDA 培养 7 d 的球孢白僵菌菌丝块转移至无菌的 EP 管(1.5 mL)2 管，封口。其中 1 管于 2011 年 11 月 1 日搭载神舟八号飞船。神舟八号飞船进入近地点约 200 公里、远地点约 330 公里的初始轨道，在轨运行 16 d 13 h。飞船返回地面后，及时取出材料，放置 4℃ 冰箱保存；另一管留在地面，常规保存在 4℃ 冰箱用作对照(CK)。

1.4 诱变菌株的筛选

将经航天诱变处理后的球孢白僵菌菌株和野生型菌株(CK)分别制成孢子悬浮液，稀释孢子浓度到 1.0×10^3 孢子/mL，均匀涂布到直径为 9 cm 的 PDA 平板上(每皿加 0.1 mL 孢子液)，25℃ 恒温培养 4 ~ 7 d 后，观察单菌落大小、形态和正反面颜色，挑选出与野生型菌株(CK)差别较明显的单菌落菌株。单菌落诱变菌株接种到 PDA 培养基上，25℃ 黑暗培养 7 d，并连续转接继代培养 5 ~ 10 代，获得

生长状况一致稳定遗传的诱变菌株。

1.5　航天诱变菌株生物学特性测定

以未搭载的野生型菌株为对照，比较航天诱变菌株在菌落形态、色素变化、生长速度、产孢量、孢子萌发率和产孢菌株的抗高温胁迫能力。

1.5.1　诱变菌株的形态和色素变化观察：从已生长好的平板上，用直径为 6 mm 的打孔器切菌落 3 块于 5 mL 含 0.5‰吐温-80 的溶液中，充分震荡，制成孢子悬浮液。用灭好菌的直径为 6 mm 的滤纸片蘸满孢子液放在培养皿中央，置于25℃温箱中培养，每个菌株 3 皿，观察菌落的形态和颜色。

1.5.2　菌丝及孢子形态观察：将一灭菌盖玻片以45°角斜插在刚接过菌的培养基上，25℃恒温培养 3 ~7 d 后将盖玻片拔出，显微观察。

1.5.3　菌落生长速度测定：用灭菌打孔器打取直径 5 mm 的菌饼，接种在 PDA 平板上，25℃黑暗培养 12 d 后，测量菌落直径。野生型菌株为对照，重复 3 次。

1.5.4　产孢量测定：将野生型菌株和诱变菌株分别培养 15 d，用直径 5 mm 的打孔器在菌落中心与边缘的中间打取 3 个菌饼，放入 3 mL 1‰的吐温-80 溶液中，迷你漩涡振荡器 PL-SC05 充分震荡 5 min 后，在显微镜下用血球计数板计数，计算产孢量，3 次重复。

1.5.5　孢子萌发率测定：将野生型菌株和诱变菌株分别培养 15 d，用直径 5 mm 的打孔器在菌落中心与边缘的中间打取 3 个菌饼，放入 3 mL 1‰的吐温-80 溶液中，洗脱孢子，调节孢子浓度至 1.0×10^3 孢子/mL，吸取 100 μL 孢子液涂板，25℃培养 3 d，统计萌发数并计算萌发率，3 次重复。

1.5.6　产孢菌株的抗高温胁迫能力：将培养 12 d 的诱变菌株和野生型菌株的分生孢子分别混于 1‰ 的吐温-80 溶液，分生孢子的终浓度为 1.0×10^3 孢子/mL，在 37℃恒温水浴锅下培养 1 h。同 1.5.5 节的方法计算萌发率。重复 3 次。

1.6　诱变菌株对松褐天牛幼虫的致病力测定

用 1‰的吐温-80 无菌水溶液将 3 个产孢诱变菌株和野生型菌株孢子均稀释至 1.0×10^7 孢子/mL 浓度的孢子悬浮液，以 1‰的吐温-80 无菌水溶液作对照。将松褐天牛幼虫在孢悬液中浸渍 15 s，然后置于无菌培养皿中让其自由爬行，使其身体表面无水滴，然后将每头松褐天牛放在直径 12 mm × 高 75 mm 的指形管中，一试管 1 头虫，管内装有人工饲料，用浸无菌水的脱脂棉封口，分别置于 25℃环境条件下黑暗培养，每处理 30 头幼虫；同时以 1‰的吐温－80 无菌水溶液代替等量孢子悬浮液作为对照。逐天观察记录天牛幼虫死亡情况，持续观察 16 d，由累计死虫率计算 LT_{50}。

1.7　高毒力诱变菌株对松木段内松褐天牛幼虫的致病力测定

4 月初从林中选取有明显松褐天牛幼虫侵入孔的松木段若干，带回室内，分为 4 组，其中 3 组分别用于 B252 和 B305 菌株及野生型菌株处理，1 组作为对照，每组 10 ~ 15 段；用 B252 和 B305 菌株及野生型菌株的孢子粉（3.0×10^{10} 孢子/g）分别装入纱布袋，纱布袋菌粉漏出均匀撒在松木段（撒菌粉法），同时向侵入孔中注射菌液（注射菌液法），注入侵入孔的这 3 个菌株菌液浓度均为 1.0×10^7 孢子/mL，每孔 1 mL。对照组不做处理，对照组与各试验组均分开，室内放置。40 d 后，剖开木段，逐一检查，计算死虫率。

1.8　数据统计分析

以上试验获得的数据均由 SPSS18.0 进行单因素方差分析（One-Way ANOVA），应用 Duncan 氏法对不同菌株多重比较（$P=0.05$），实验数据采用平均值 ± 标准差（mean ± SD，$n=3$）表示。

2　结果与分析

2.1　球孢白僵菌航天诱变菌株生物学特性

2.1.1　培养形态：与野生型菌株 cfcc81357 对比发现，9 个诱变菌株在 PDA 平板上的菌落颜色、菌落形态以及基质色泽与野生型菌株均有不同程度的差异（图 1，表 1）。根据菌落形态可以分为 3 个类型：一类为棉絮状菌落，分别为 BJ-80，B122，B130，B260 和 B283；另一类为粉状分别为 B159，B252 和 B305，均产生分生孢子，与野生型菌株菌落一致；还有一类为毡状，仅有 BJ-1。在菌落色泽方面，多数菌落为白色，分别是 B122，B130，B252，B260 和 B305，BJ-80 和 B283 也为白色，但菌落边缘黄色；BJ-1 菌落色泽为灰白色；B159 菌落色泽与原始菌株一致，没有变化。在基质色泽方面：多数为淡黄色，分别是 B122，B130，B159，B252 和 B305，与原始菌株没有差别；3 个菌株为黄色，分别是 BJ-80，B260 和 B283；仅 BJ-1 为乳白色。通过比较，BJ-1 在菌落形态、菌落色泽和基质色泽方面变化最大。诱变菌株这些形态学特征变化表明航天环境影响了菌落颜色和色素积累等。

表 1 球孢白僵菌航天诱变菌株的菌落形态特征

Table 1 The morphology of aerospace mutants of *Beauveria bassiana*

菌株 Strains	基质色泽 Matrix color	菌落色泽 Colony color	菌落形态 Colony morphology
cfcc81357 *	淡黄色 Light yellow	乳白色 Creamy white	粉状，菌落薄，凹凸不平且具褶皱，边缘整齐 Powder-like, thin colony, uneven and fold, regular edge
BJ-1	乳白色 Creamy white	灰白色 Grayish white	毡状，菌落薄，菌丝放射状平铺于培养基上 Felt-like, thin colony, radial mycelium on the medium
BJ-80	黄色 Yellow	白色，边缘黄色 White, yellow edge	棉絮状，菌落厚 Cotton-like, thick colony
B122	淡黄色 Light yellow	白色 White	棉絮状，菌落厚，菌丝发达，边缘不规则 Cotton-like, thick colony, developed mycelium, irregular edge
B130	淡黄色 Light yellow	白色 White	棉絮状，菌落厚，菌丝发达，边缘不规则 Cotton-like, thick colony, developed mycelium, irregular edge
B159	淡黄色 Light yellow	乳白色 Creamy white	粉状，菌落薄，中间褶皱，边缘不规则 Powder-like, thin colony with fold in the center, irregular edge
B252	淡黄色 Light yellow	白色 White	粉状，菌落薄，边缘整齐 Powder-like, thin colony, regular edge
B260	黄色 Yellow	白色 White	棉絮状，菌落厚，形成乳突状突起，菌丝发达 Cotton-like, thick colony with papillary projections, developed mycelium
B283	黄色 Yellow	白色，边缘黄色 White, yellow edge	棉絮状，菌落厚，中间凹陷 Cotton-like, thick colony with sunken areas in the center
B305	淡黄色 Light yellow	白色 White	粉状，菌落薄，边缘整齐 Powder-like, thin colony, regular edge

* 用作对照的生型菌株 A wild-type strain used as the control. 下同 The same below.

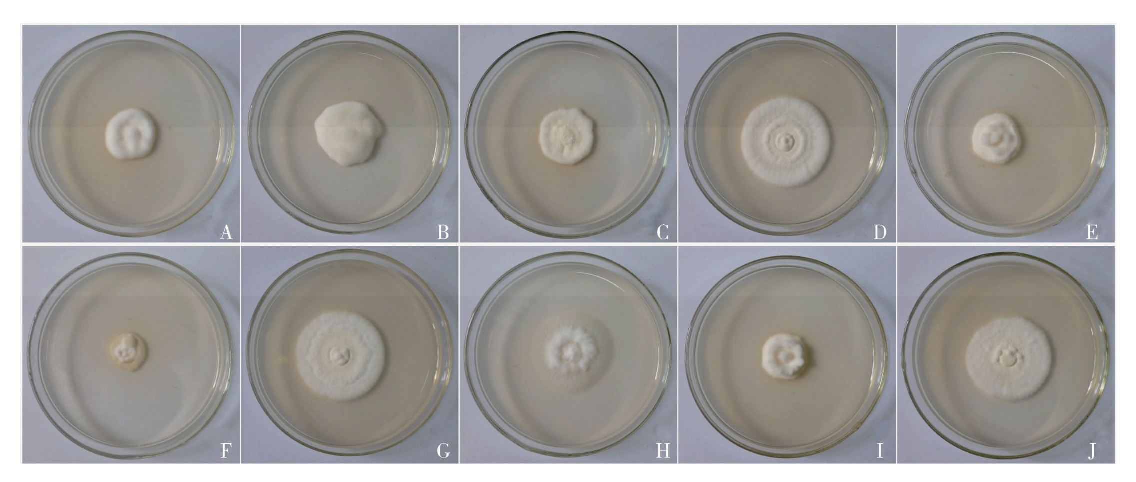


图 1 球孢白僵菌航天诱变菌株的菌落形态

Fig. 1 The morphology of aerospace mutants of *Beauveria bassiana*

A: B122; B: B130; C: B159; D: B252; E: B260; F: B283; G: B305; H: BJ-1; I: BJ-80; J: 野生型菌株 Wild-type strain cfcc81357 (CK).

2.1.2 菌丝及孢子形态观察：通过显微镜观察，9 个诱变菌株菌丝与野生型菌株无明显差异(图 2)。仅 3 个菌株 B159, B252 和 B305 的分生孢子梗着生在营养菌丝上，产孢细胞簇生于菌丝、分生孢子梗或膨大的孢囊上，瓶形，颈部明显延长成产孢轴，轴上具有小齿突，呈“之”字形弯曲，产孢细胞和泡囊常增生，在分生孢子梗或菌丝上聚成球形至卵形的相当密实的孢子头，分生孢子球形或近球形，透明光滑，2.2 ~ 2.9 μm × 2.0 ~ 2.5 μm，与野生型菌株无明显差异。

2.1.3 菌落生长速率：菌株营养生长快慢是生防菌株优良性状指标之一。25℃ 培养 12 d 后航天诱变菌株的菌落直径见表 2。不同菌株的菌落直径有所不同，航天诱变菌株的菌落生长速率大多出现负向变异。通过方差分析表明，菌株 BJ-1, B252 和 B305 的菌落直径与野生型菌株差异不显著；其余 6 个菌株菌落直径与野生型菌株相较，菌落直径差异显著，明显降低($P < 0.05$)。

2.1.4 产孢量和孢子萌发率比较：产孢量是衡量优良生防菌株的主要指标。9 个诱变菌株中仅 3 株产生分生孢子，分别是 B159, B252 和 B305，产孢量见表3。通过显微镜观察也可以说明其他6株无

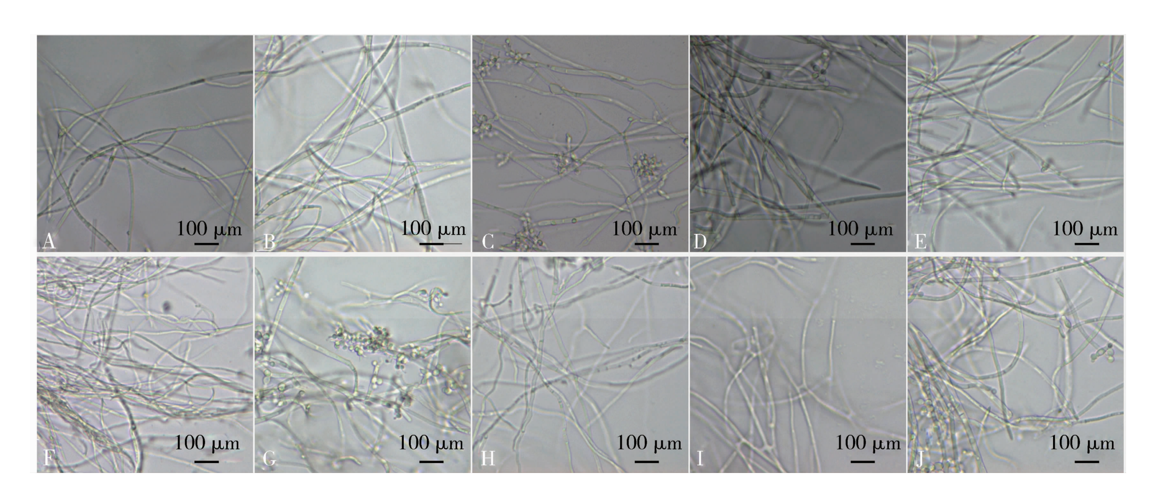


图 2　球孢白僵菌航天诱变菌株的菌丝形态

Fig. 2　The mycelial morphology of aerospace mutants of *Beauveria bassiana*

A: B122; B: B130; C: B159; D: B252; E: B260; F: B283; G: B305; H: BJ-1; I: BJ-80; J: 野生型菌株 cfcc81357 Wild-type strain cfcc81357 (CK).

表 2　球孢白僵菌航天诱变菌株的菌落直径

Table 2　Colony growth of aerospace mutants of *Beauveria bassiana*

菌株 Strains	菌落直径(cm) Colony diameter	菌株 Strains	菌落直径(cm) Colony diameter
cfcc81357	5.37 ±0.06	B159	3.43 ±0.06 *
BJ-1	5.27 ±0.06	B252	5.37 ±0.06
BJ-80	2.27 ±0.21 *	B260	2.13 ±0.15 *
B122	3.20 ±0.20 *	B283	2.27 ±0.06 *
B130	4.23 ±0.25 *	B305	5.30 ±0.10

星号代表在显著性水平 $P = 0.05$ 时与野生型菌株 cfcc81357 相比具有显著性差异(Duncan 氏法)；表 3 同。The asterisk represents significant difference compared with the wild-type strain cfcc81357 at the 0.05 level by Duncan's test. The same for Table 3.

孢子产生。方差分析表明 B159 产孢量显著减少，B252 产孢量显著增大($P < 0.05$)，B305 与野生型菌株差异不显著($P > 0.05$)。产孢的 3 个诱变菌株的孢子萌发率与野生型菌株相比较，诱变菌株 B159 孢子萌发率比野生型菌株显著下降($P < 0.05$)，诱变菌株 B252 和 B305 孢子萌发率比野生型菌株下降较少，且差异不显著($P > 0.05$)。

表 3　球孢白僵菌航天诱变菌株的产孢量和孢子萌发率

Table 3　Spore production and conidia germination of aerospace mutants of *Beauveria bassiana*

菌株 Strains	每 cm^2 产孢量($\times 10^7$ 孢子/mL) Spore production per cm^2 ($\times 10^7$ spores/mL)	孢子萌发率(%) Conidia germination rate
cfcc81357	8.94 ±1.48	75.83 ±2.08
B159	5.14 ±0.29 *	65.33 ±3.01 *
B252	11.01 ±0.75 *	74.67 ±3.21
B305	8.62 ±1.14	74.50 ±1.50

2.1.5　产孢菌株的抗高温胁迫能力：温度是衡量生防真菌抗逆性强弱的一个重要指标，因为温度不仅影响真菌孢子的萌发生长，还影响孢子制剂的贮存稳定性。球孢白僵菌分生孢子的萌发为影响其致病力的一个重要因子。有研究结果认为，球孢白僵菌分生孢子萌发最适温度为 5 ~ 35℃(林华峰等，1998；Iskandarov *et al.*，2006)。本研究中，将培养 12 d 的突变体和原始菌株在 37℃恒温下培养 1 h，经过热处理后，B159，B252 和 B305 和野生型菌株一样，孢子萌发率均有所下降，但它们之间的差异不显著($P > 0.05$)(表 4)。

表 4　球孢白僵菌航天诱变菌株 37℃热处理 1 h 后的孢子萌发率

Table 4　Conidia germination rate of aerospace mutants of *Beauveria bassiana* after exposure to 37℃ for 1 h

菌株 Strains	孢子萌发率(%) Conidia germination rate
cfcc81357	58.67 ±1.44
B159	59.67 ±3.01
B252	63.00 ±2.00
B305	59.33 ±3.51

2.2　球孢白僵菌产孢诱变菌株对松褐天牛 4 龄幼虫的致病力

产孢的 3 个诱变菌株 B159，B252 和 B305 对松褐天牛 4 龄幼虫的致病力有所不同(表 5)。诱变菌株 B252 和 B305 对松褐天牛 4 龄幼虫具有较强的致病力，在 14 d 时校正死亡率均为 100%，远高于野生型菌株；而诱变菌株 B159 对松褐天牛 4 龄幼虫具有较弱的致病力，在 16 d 的校正死亡率远低于诱变菌株 B252，B305 和野生型菌株。LT_{50} 也可以反映出菌株对松褐天牛 4 龄幼虫的致病力和致病速

度。死亡率越大，致病力越强；LT_{50}越小，致病力越强，致病速度越快。诱变菌株 B252 和 B305 的 LT_{50}低于诱变菌株 B159 和野生型菌株，因此 B252 和 B305 的致病力较强。

2.3 高毒力诱变菌株对松木段内松褐天牛幼虫的致病力

无论采用撒菌粉法还是注射菌液法，诱变菌株 B252 和 B305 对木段内天牛幼虫的致死率都较野生型菌株高（表 6）；注射菌液法的效果要比撒粉法要好一些，说明如何使用合适的方法让菌与天牛接触十分重要。这也说明诱变菌株 B252 和 B305 杀死木段内的松褐天牛幼虫的能力与菌株的致病力高低是一致的。结果表明 B252 和 B305 可能作为优良菌株，具有生防潜力。

表 5 球孢白僵菌航天诱变菌株对松褐天牛 4 龄幼虫的致病力

Table 5 The pathogenicity of aerospace mutants of *Beauveria bassiana* against the 4th instar larvae of *Monochamus alternatus*

菌株 Strains	幼虫死亡率 Larval mortality (%) 4 d	6 d	8 d	10 d	12 d	14 d	16 d	校正死亡率(%) Corrected mortality	LT_{50} (d)
cfcc81357	0	0	40.00	46.67	60.00	66.67	76.67	75.87	10.89
B159	0	0	0	6.67	16.67	23.33	30.00	27.59	18.89
B252	13.33	26.67	36.67	53.33	76.67	100	100	100	8.08
B305	16.67	30.00	33.33	66.67	100	100	100	100	8.56
含 1‰吐温-80 的灭菌水 Sterile water with 1‰ Tween-80	0	0	0	0	0	3.33	3.33	–	0.00

表 6 球孢白僵菌航天诱变菌株不同应用方法的比较

Table 6 Comparison of different treatment methods for aerospace mutants of *Beauveria bassiana*

处理方法 Treatment method	菌株 Strains	调查幼虫数 Number of larvae tested	死亡幼虫数 Number of died larvae	死亡率(%) Mortality	校正死亡率(%) Corrected mortality
撒菌粉 Sprinkling conidia powder	B252	138	55	39.86	39.25
	B305	142	50	35.21	34.56
	cfcc81357	125	36	28.80	28.08
注射 Injecting conidia liquid	B252	100	43	43.00	42.42
	B305	100	42	42.00	41.41
	cfcc81357	100	32	32.00	31.31
未处理(CK) Non-treatment	–	200	2	1.00	–

3 讨论

航天诱变微生物象其他微生物诱变育种一样，诱变后的微生物必需通过各种性状的检测，以判断航天诱变的效应和筛选得到特定变异的目标品种，因此筛选工作量非常繁重。在本研究中，来源于松褐天牛的球孢白僵菌搭载神舟八号飞船，获得的诱变菌株在菌落形态、生长速率、产孢能力和对松褐天牛的致病力上均有一定程度的差异。在生长速率和产孢能力方面，航天诱变的负效应大于正效应；而生长速率、产孢量和致病力是筛选生物防治菌株的重要指标，航天诱变使这些特性表现出不同变异趋向和幅度，证明了航天诱变是非定点的、广泛性的、正负双向性的，且诱变位点多、诱变率高，所导致的生物体变异有生理性变异也可能有遗传性变异（农向群等，2006）。航天诱变菌株 B252 和 B305 在致病力方面发生了较大幅度的正向变异，下一步将比较分析诱变前后菌株生长、侵染和杀虫相关因子（包括相关基因和次生代谢产物），探讨航天诱变的机制及诱变菌株致病力增强的原因。

本研究中，首先根据菌落的形态和色素变化筛选出 9 株球孢白僵菌航天诱变菌株，再根据诱变菌株菌落生长、是否产孢生物学特性，筛选出了 3 株球孢白僵菌航天诱变菌株，再考察 3 株诱变菌株的产孢能力、孢子萌发能力及抗高温胁迫能力和对松褐天牛幼虫的致病力，筛选出对松褐天牛高致病力的航天诱变菌株 B252 和 B305，这两个菌株表现对松褐天牛的杀虫速度较快，致病力高的优点，通过撒菌粉法和注射菌液法对木段内松褐天牛幼虫也有

一定的杀虫效果，说明这两个诱变菌株在今后松褐天牛的林间防治中具有很大的应用潜力。

参考文献（References）

Han B, Piao CG, Wang LF, Li Y, 2007. Survey and identification of pathogens in the pine sawyer beetle, *Monochamus alternatus*, at forest farm of Maanshan, Anhui province, and studies on their virulence to it. *Forest Research*, 20(2): 204 – 208. [韩兵，朴春根，汪来发，李永，2007. 马鞍山林场松墨天牛病原微生物种类调查鉴定及毒力测定研究. 林业科学研究，20(2)：204 – 208]

He XY, Chen SL, Huang JS, 2005. Preliminary screening of virulent strains of *Metarhizium anisopliae* against *Monochamus alternatus*. *Acta Entomologica Sinica*, 48(6): 975 – 981. [何学友，陈顺立，黄金水，2005. 感染松墨天牛的金龟子绿僵菌菌株的初步筛选. 昆虫学报，48(6)：975 – 981]

Iskandarov US, Guzalova AG, Davranov KD, 2005. Effects of nutrient medium composition and temperature on the germination of conidia and the entomopathogenic activity of the fungi. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 42(1): 81 – 85.

Li ZZ, Huang B, Chen MJ, Wang B, Fan MZ, 2011. Studies on the genus *Beauveria* in molecular era. *Mycosystema*, 30(6): 823 – 835. [李增智，黄勃，陈名君，王滨，樊美珍，2011. 分子时代的白僵菌研究. 菌物学报，30(6)：823 – 835]

Lin HF, Fan MZ, Li ZZ, Hu C, 1998. Pathogenic effect of *Beauveria bassiana* infected on *Dendrolimus punctatus* under different temperature and humidity. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 9(2): 195 – 200. [林华峰，樊美珍，李增智，胡萃，1998. 不同温湿度下白僵菌对松毛虫的侵染致病效应. 应用生态学报，9(2)：195 – 200]

Liu HJ, Piao CG, Wang LF, Shin SC, Chung YJ, Shu QL, 2007. Biocontrol of *Monochamus alternatus* by *Beauveria bassiana* and *Scleroderma guani*. *Scientia Silvae Sinicae*, 43(5): 64 – 68. [刘洪剑，朴春根，汪来发，申相澈，郑荣镇，束庆龙，2007. 白僵菌和肿腿蜂对松墨天牛幼虫作用研究. 林业科学，43(5)：64 – 68]

Liu LX, 2003. Space technology and space industry: prospects and future. In: Chinese Academy of Sciences ed. High Technology Development Reports. Science Press, Beijing. 244 – 251. [刘录祥，2003. 空间技术与空间产业——前景与未来. 见：中国科学院 主编. 高技术发展报告. 北京：科学出版社. 244 – 251]

Nong XQ, Zhang ZH, Hu P, Gao S, Zhang LS, 2006. Effect of aerospace mutation on entomopathogenic fungi. *Mycosystema*, 25(4): 674 – 681. [农向群，张泽华，胡攀，高松，张礼生，2006. 航天诱变对昆虫病原真菌的生物学效应. 菌物学报，25(4)：674 – 681]

Pu ZL, Li ZZ, 1996. Insect Mycology. Anhui Science &Technology Publishing House, Hefei. 387 – 390. [蒲蛰龙，李增智，1996. 昆虫真菌学. 合肥：安徽科学技术出版社. 387 – 390]

Shimazu M, 1994. Potential of the cerambycid-parasitic type of *Beauveria brongniartii* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for microbial control of *Monochamus alternatus* Hope. *Appl. Entomol. Zool.*, 29: 127 – 130.

Sun JM, Ding S, Xiao H, 1997. Study on the control of *Monochamus alternatus* with *Beauveria bassiana*. *Forest Pest and Disease*, (3): 16 – 18. [孙继美，丁珊，肖华，1997. 球孢白僵菌防治松褐天牛的研究. 森林病虫通讯，(3)：16 – 18]

Wang SB, Huang YP, Zhang XT, Liu YP, Fan MZ, Li ZZ, 2005. Screening and biological control of high virulent strains against *Monochamus alternatus* adults. *Forest Pest and Disease*, 23(6): 13 – 16. [王四宝，黄勇平，张心团，刘云鹏，樊美珍，李增智，2005. 松褐天牛成虫高毒力病原菌筛选及林间感染试验. 中国森林病虫，23(6)：13 – 16]

Xu FY, Zhang P, Zhao JL, Wang MM, Xu KQ, Jia SH, 2000. Studies on controlling pine wood nematodes by the techniques of *Beauveria bassiana* released by boring beetle. *Forest Research*, 13(Mem.): 63 – 68. [徐福元，张培，赵菊林，王敏敏，徐克勤，贾生华，2000. 利用小蠹虫释传白僵菌技术防治松材线虫病的研究. 林业科学研究，13(专刊)：63 – 68]

Yang BJ, Pan HY, Tang J, Wang YY, Wang LF, 2003. Pinewood Nematode Disease. China Forestry Publishing House, Beijing. 1 – 9. [杨宝君，潘宏阳，汤坚，王玉嫦，汪来发，2003. 松材线虫病. 北京：中国林业出版社. 1 – 9]

Zhang LH, Tian XS, 2004. Status in space microorganism mutation breeding. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*, 18(4): 294 – 296. [张玲华，田兴山，2004. 微生物空间诱变育种的研究进展. 核农学报，18(4)：294 – 296]

Zhang LQ, Liu J, Wu H, 2000. The screening virulent strain of *Beauveria bassiana* to *Monochamus alternatus*. *Journal of Nanjing Forestry University*, 24(2): 33 – 37. [张立钦，刘军，吴鸿，2000. 松墨天牛优良白僵菌菌株筛选. 南京林业大学学报，24(2)：33 – 37]

（责任编辑：赵利辉）